

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-345485

(43)Date of publication of application : 03.12.2002

(51)Int.Cl. C12N 15/09

A01H 1/04

C12Q 1/68

(21)Application number : 2001-247600

(71)Applicant : JAPAN TOBACCO INC
SYNGENTA LTD

(22)Date of filing : 17.08.2001

(72)Inventor : KOMORI TOSHIYUKI
YAMAMOTO TOSHINAKA
NITTA NAOTO
TAKEMORI NAOKI

(30)Priority

Priority number : 2000247204

Priority date : 17.08.2000

Priority country : JP

(54) METHOD FOR ESTIMATING GENOTYPE OF FERTILITY RESTORATIVE GENE LOCUS FOR ORYZA SATIVA BT-TYPE MALE STERILE CYTOPLASM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting the fertility restorative gene (Rf-1 gene) of Oryza sativa individuals for RT-type male sterile cytoplasm having been utilized for raising hybrid rice.

SOLUTION: This method comprises detecting the Rf-1 gene by making use of the fact that a plurality of PCR marker loci present in the proximity of the Rf-1 gene locus link with the Rf-1 gene locus. More specifically, this method comprises easily and accurately investigating the presence/absence of the Rf-1 gene and screening Rf-1 gene homo-type individual(s) by assaying the genotype of the plurality of PCR marker loci present in the proximity of the Rf-1 gene locus by making use of the fact that the Rf-1 gene locus lies between the new PCR marker loci, i.e. S12564 Tsp509I locus and C1361 MwoI locus, present on the Oryza sativa 10th chromosome.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

METHOD FOR ESTIMATING GENOTYPE OF FERTILITY RESTORATIVE GENE LOCUS FOR ORYZA SATIVA BT-TYPE MALE STERILE CYTOPLASM**Publication number:** JP2002345485**Publication date:** 2002-12-03**Inventor:** KOMORI TOSHIYUKI; YAMAMOTO TOSHINAKA; NITTA NAOTO; TAKEMORI NAOKI**Applicant:** JAPAN TOBACCO INC; SYNGENTA LTD**Classification:****- international:** A01H1/04; C12N15/09; C12Q1/68; A01H1/04; C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/09; A01H1/04; C12Q1/68**- European:****Application number:** JP20010247600 20010817**Priority number(s):** JP20010247600 20010817; JP20000247204 20000817**Report a data error here****Abstract of JP2002345485**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting the fertility restorative gene (Rf-1 gene) of *Oryza sativa* individuals for RT-type male sterile cytoplasm having been utilized for raising hybrid rice. **SOLUTION:** This method comprises detecting the Rf-1 gene by making use of the fact that a plurality of PCR marker loci present in the proximity of the Rf-1 gene locus link with the Rf-1 gene locus. More specifically, this method comprises easily and accurately investigating the presence/absence of the Rf-1 gene and screening Rf-1 gene homo-type individual(s) by assaying the genotype of the plurality of PCR marker loci present in the proximity of the Rf-1 gene locus by making use of the fact that the Rf-1 gene locus lies between the new PCR marker loci, i.e. S12564 Tsp509I locus and C1361 MwoI locus, present on the *Oryza sativa* 10th chromosome.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-345485

(P2002-345485A)

(43) 公開日 平成14年12月3日 (2002. 12. 3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 1/04	2 B 0 3 0
A 0 1 H 1/04		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2001-247600 (P2001-247600)

(22) 出願日 平成13年8月17日 (2001. 8. 17)

(31) 優先権主張番号 特願2000-247204 (P2000-247204)

(32) 優先日 平成12年8月17日 (2000. 8. 17)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000004569

日本たばこ産業株式会社

東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

(71) 出願人 593005116

シンジェンタ リミテッド

イギリス国 サリー ジーユー2 7ワイ

エッチ、ギルドフォード、サリー リサー

チ パーク、プリーストリー ロード

(72) 発明者 小森 俊之

静岡県磐田郡豊田町東原700番地 株式会

社オリノバ内

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イネBT型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子座の遺伝子型を推定する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ハイブリッドライス育成に利用されているBT型雄性不稔細胞質に対するイネ個体の稔性回復遺伝子 (Rf-1遺伝子) を検出する方法を提供する。

【解決手段】 Rf-1遺伝子座の近傍に存在する複数のPCRマーカー座が、Rf-1遺伝子座と連鎖することを利用して、Rf-1遺伝子を検出する方法に関する。さらに具体的には、本発明は、Rf-1遺伝子座がイネ第10染色体上に存在する新規のPCRマーカー座S12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座との間に座乗することを利用して、近傍に存在する複数のPCRマーカー座の遺伝子型を検定することにより、Rf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 稔性回復遺伝子 (Rf-1 遺伝子) 座がイネ第 10 染色体上の RFLP マーカー座 S12564 座と C1361 座との間に座乗することを利用して、被検定イネ個体または種子が Rf-1 遺伝子を持つか否かを識別する方法。

【請求項 2】 次の PCR マーカー：

- (1) SEQ ID NO:1 および SEQ ID NO:2 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 EcoRI 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCR マーカー R1877 EcoRI；
- (2) SEQ ID NO:3 および SEQ ID NO:4 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 HindIII 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCR マーカー G4003 HindIII；
- (3) SEQ ID NO:5 および SEQ ID NO:6 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 MwoI 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCR マーカー C1361 MwoI；
- (4) SEQ ID NO:7 および SEQ ID NO:8 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 MwoI 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCR マーカー G2155 MwoI；
- (5) SEQ ID NO:9 および SEQ ID NO:10 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 MspI 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCR マーカー G291 MspI；
- (6) SEQ ID NO:11 および SEQ ID NO:12 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 BslI 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCR マーカー R2303 BslI；
- (7) SEQ ID NO:13 および SEQ ID NO:14 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 BstUI 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCR マーカー S10019 BstUI；
- (8) SEQ ID NO:15 および SEQ ID NO:16 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 KpnI 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCR マーカー S10602 KpnI；および
- (9) SEQ ID NO:17 および SEQ ID NO:18 の配列を有する DNA をプライマーとして用いてゲノミック PCR を行い、得られた産物中の、制限酵素 Tsp509I 認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネ

の間の多型を検出する、PCR マーカー S12564 Tsp509I；からなる群から選択される PCR マーカーの少なくとも 1 個を検出することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 (a) PCR マーカー R1877 EcoRI、G291 MspI、R2303 BslI および S12564 Tsp509I からなる群から選択される少なくとも 1 個の PCR マーカー、および、(b) PCR マーカー C1361 MwoI、S10019 BstUI、G4003 HindIII、S10602 KpnI および G2155 MwoI からなる群から選択される少なくとも 1 個の PCR マーカーの両者が増幅産物中に存在する場合に、被検定イネ植物個体または種子が Rf-1 遺伝子を有すると判断する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 PCR マーカー S12564 Tsp509I および C1361 MwoI の存在を調べることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 請求項 3 に記載した (a) 及び (b) のうちの少なくとも一方の群の PCR マーカーの 2 個以上を用いて、被検定個体の Rf-1 遺伝子座周辺遺伝子座の遺伝子型を検定することにより、Rf-1 遺伝子ドナー親由来の導入染色体領域を調べる方法。

【請求項 6】 SEQ ID NO:1~18 のいずれか 1 つの配列を有する、請求項 2 の方法に使用するプライマー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ジャポニカ米-ジャポニカ米ハイブリッドライス育成に利用されている BT 型雄性不稔細胞質に対するイネ個体の稔性回復遺伝子 (Rf-1 遺伝子) を検出する方法に関する。

【0002】 より具体的には、本発明は、Rf-1 遺伝子座がイネ第 10 染色体上に存在する DNA マーカー座 S12564 Tsp509I 座と C1361 MwoI 座との間に座乗することを利用して、近傍に存在する PCR マーカーを検出することにより、Rf-1 遺伝子の有無の調査および Rf-1 遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施する方法に関する。

【0003】

【従来の技術】 イネは自殖性植物であるため、品種間で交雑を行う場合には、まず自家受精を避けるためにイネの穎花が開花する直前に穎花内の雄しべを全て取り除き、次いで交雑をする花粉親品種由来の花粉を用いて受精させる必要がある。しかしながら、このような手作業による交雑方法で商業的規模での大量の雑種種子の生産をすることは不可能である。

【0004】 そこで、ハイブリッドライスの生産には、細胞質雄性不稔を利用する三系法が利用されている。三系法とは、雄性不稔細胞質を保有する系統である不稔系統、Rf-1 遺伝子を保有する系統である回復系統、および核遺伝子是不稔系統と同一であって不稔細胞質を保有しない系統である維持系統とを使用する方法をいう。これらの 3 品種を用いて、(i) 不稔系統に回復系統の花粉を受精させることによりハイブリッド種子を獲得することができ、(ii) 一方、不稔系統に維持系統の花粉を受精させ

ることにより不稔系統を維持することができる。

【0005】三系法でBT型雄性不稔細胞質を利用するにあたっては、回復系統のイネを育成するために、育種における各過程で育成中のイネがRf-1遺伝子を保有すること、また、最終段階ではRf-1遺伝子をホモで保有することを確認する必要がある。また、三系法において、回復系統に使用する品種が確実にRf-1遺伝子を保有することを調べたり、得られたハイブリッド種子が稔性を回復しているか確認するために、Rf-1遺伝子の存在を調べる必要が生じる場合もある。

【0006】従来、植物体中でのRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定するためには、まず、検定系統と交配を行った交配種子から植物体(F1)を形成し、次いでF1植物を自殖させてその種子の形成率が一定以上(例えば70~80%以上)である個体の出現頻度を調査する必要がある。なお、検定系統とは、維持系統、不稔系統あるいは両系統のセットを指し、目的とする被検定個体の細胞質がBT型か通常細胞質か、あるいは不明かにより適宜選択するものである。不稔系統の場合は母親として、維持系統の場合は父親として、それぞれ被検定個体に交配する。

【0007】しかしながら、これらの方法を行うには、莫大な労力と時間を要する。また、種子稔性は、環境要因の影響を受けやすいので、低温・日照不足などの不良環境で調査すれば、遺伝子型の構成によらず不稔になる場合があり、Rf-1遺伝子座の遺伝子型推定が正確に行えないという問題を有していた。

【0008】このような問題を解消するために、最近では、分子生物学的方法によりRf-1遺伝子の存在を判別する方法も提案されている。それは、Rf-1遺伝子と連鎖する塩基配列(以下、DNAマーカーという)を検出することにより、Rf-1遺伝子の存在または不存在を調べる方法である。因みに、Rf-1遺伝子のDNA配列は未解読であるため、直接Rf-1遺伝子を検出することは、現在の技術では不可能である。

【0009】例えば、イネのRf-1遺伝子座は第10染色体上に存在し、そして、制限酵素断片長多型(RFLP)解析に使用することができるDNAマーカー(RFLPマーカー)座G291とG127との間であることが報告されている(Fukuta et al. 1992, Jpn J. Breed. 42 (supl.1) 164-165)。このように、Rf-1遺伝子と連鎖するDNAマーカー座G291およびG127の遺伝子型を調査することにより、Rf-1遺伝子座の遺伝子型を推定する方法が知られている。

【0010】しかしながら、従来の分子生物学的方法にはいくつかの問題が存在する。第一の問題は、従来の方法では、使用するマーカーがRFLPマーカーであり、これを検出するためにはサザンブロット解析を行う必要があるという点である。サザンブロット解析を行うためには、被検定個体から数マイクログラム単位のDNAの精製を必要とし、さらに制限酵素処理、電気泳動、ブロッテ

イング、プローブとのハイブリダイゼーション、およびシグナルの検出からなる一連の作業手順を行う必要があるため、多大な労力が必要であるうえに、検定結果を得るまでに1週間程度かかっていた。

【0011】第二の問題は、RFLPマーカー座G291とG127の間の遺伝子地図距離は約30 cM(イネDNAでは約9000 kbpに相当する)と長いため、二重組換えが起こる可能性が数%程度はあると考えられ、Rf-1遺伝子座の遺伝子型が必ずしも正確に推定できないことである。

【0012】さらに第三の問題は、Rf-1遺伝子の存在をRFLPマーカー座G291およびG127を検出することにより推定する場合、育種の結果選抜される稔性回復系統には、Rf-1遺伝子と共に、RFLPマーカー座G291とG127の間の遺伝子領域も導入されるという点である。その結果、導入DNA配列は30 cM以上のRf-1遺伝子ドナー親由来の染色体領域を有することになり、導入DNA領域中に存在する可能性がある劣悪遺伝子をRf-1遺伝子と同時に導入してしまう危険性があった。

【0013】このような問題を解決するため、Rf-1遺伝子座と連鎖する優性DNAマーカー(特開平7-222588)および共優性DNAマーカー(特開平9-313187)が開発されている。これらのマーカーは、Rf-1遺伝子座とそれぞれ、 1.6 ± 0.7 cM(イネDNAでは約480 kbpに相当)および 3.7 ± 1.1 cM(イネDNAでは約1110 kbpに相当)の遺伝距離で連鎖しており、両座はRf-1遺伝子座を挟む位置関係にある。そのため、優性PCRマーカー座および共優性PCRマーカー座は、これらが両方とも存在することを検出することにより、Rf-1遺伝子の存在を推定することができる。また、共優性PCRマーカーの使用は、Rf-1遺伝子座の遺伝子型がホモかヘテロかも推定することを可能にする。

【0014】しかしながら、これらのPCRマーカーを使用する場合にも、依然としていくつかの問題がある。この共優性マーカーはRf-1遺伝子座と 3.7 ± 1.1 cMの遺伝距離を有するため、Rf-1遺伝子座との間での組換え頻度が高いという問題が十分には解決されていない。その結果、共優性マーカー自体についてはホモ型またはヘテロ型まで正確に検出することができるが、共優性マーカー座とRf-1遺伝子座との間で組換えが生じる場合に、Rf-1遺伝子座の遺伝子型の推定、特にホモ型またはヘテロ型までの推定を正確に実施できないという問題がある。一方、優性マーカーを使用してRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定する場合、優性マーカーではRf-1遺伝子がホモの個体(Rf-1/Rf-1)およびヘテロの個体(Rf-1/rf-1)の両方を区別することなく検出してしまふ。そのため、上記共優性マーカーと優性マーカーとを組み合わせて利用してRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定したとしても、Rf-1遺伝子に関するホモ型とヘテロ型とを正確に識別することはできない。また、優性マーカーを用いて行うPCRでは、PCR産物が得られなかった場合には、実験操作上の

問題に起因する可能性も否定できない。さらに、これらの共優性マーカーと優性マーカーとの間の遺伝子距離が約5.3 cM (約1590 kbp) と離れているため、Rf-1遺伝子ドナー親からの導入染色体領域長を短い長さに限定することができないので、この領域中に含まれる劣悪遺伝子の持ち込みを抑制できないという問題点も有している。

【0015】さらに、特開2000-139465号には、イネ第10染色体のRf-1遺伝子の近傍に座乗するRFLPマーカーの塩基配列に基づいて開発された、共優性PCRマーカーが記載されている。しかしながら、それらのPCRマーカーの多くは、Rf-1遺伝子からの遺伝子距離が約1cMより離れているという問題がある。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、Rf-1遺伝子座と密接に連鎖し、かつ、Rf-1遺伝子座を挟む位置関係にある複数の共優性PCRマーカーを開発することにより、Rf-1遺伝子座の存在及び、それがヘテロまたはホモのいずれで存在するかを簡便かつ正確に推定する方法を提供することである。

【0017】

【課題を解決するための手段】本発明は、ハイブリッドライス育成に利用されているBT型雄性不稔細胞質に対する回復遺伝子であるRf-1遺伝子を検出する方法を提供する。より具体的には、本発明者らはRf-1遺伝子座の存在部位を第10染色体の極めて狭い範囲に特定した。本発明はその結果に基づいて、Rf-1遺伝子座の近傍に存在するPCRマーカーを開発し、これらのPCRマーカーが、Rf-1遺伝子座と連鎖することを利用して、Rf-1遺伝子座を検出する方法を提供する。具体的には、本発明は、Rf-1遺伝子座が、イネ第10染色体上に存在するPCRマーカー座S12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座との間に座乗することを利用して、近傍に存在する新規のPCRマーカーを検出することにより、Rf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施する。

【0018】マーカー

Rf-1遺伝子座の近傍に存在する特定の領域に対して設計したプライマー対を用いてPCRを行い、その産物を特定の制限酵素で処理後電気泳動にかけると、ジャポニカ系統とインディカ系統との間で、異なる大きさのバンドが観察されることがある。その用な場合、本明細書においては、インディカ系統に特徴的なバンドをRf-1連鎖バンドとする。本発明により、Rf-1遺伝子座は、イネ第10染色体上に存在するPCRマーカー座S12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座との間に座乗することが明らかになったので、その周辺でのPCRマーカーは、当業者が適宜開発して使用可能である。

【0019】例えば、本発明は下記の群から選択されるPCRマーカーの少なくとも1個を被検体イネのゲノム中に存在するか否か検出することにより、被検定個体がこれらのPCRマーカーと連鎖するRf-1遺伝子を持つか否かを

識別する：

(1) マーカー1： SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素EcoRI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーR1877 EcoRI；

(2) マーカー2： SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素HindIII認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーG4003 HindIII (SEQ ID NO:19)；

(3) マーカー3： SEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:6の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MwoI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーC1361 MwoI (SEQ ID NO:20)；

(4) マーカー4： SEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MwoI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーG2155 MwoI (SEQ ID NO:21)；

(5) マーカー5： SEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:10の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MspI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーG291 MspI (SEQ ID NO:22)；

(6) マーカー6： SEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素BslI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーR2303 BslI (SEQ ID NO:23)；

(7) マーカー7： SEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素BstUI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS10019 BstUI (SEQ ID NO:24)；

(8) マーカー8： SEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:16の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素KpnI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS10602 KpnI (SEQ ID NO:25)；および

(9) マーカー9： SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミッ

10

20

30

40

50

クPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素Tsp509I認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS12564 Ts p509I (SEQ ID NO:26)。

【0020】なお、上記PCRマーカーは、Rf-1遺伝子座が、イネ第10染色体上の9個のRFLPマーカー領域R1877、G291、R2303、S12564、C1361、S10019、G4003、S10602、およびG2155付近に座乗する可能性が高いと考え (Fukuta et al. 1992, Jpn J. Breed. 42 (supl.1) 164-165によるRFLP連鎖解析結果、およびHarushima et al. 1998, Genetics 148 479-494によるイネRFLP連鎖地図を参照)、これらのRFLPマーカーを、後記実施例1に記載するようにして、共優性PCRマーカーであるCAPSマーカーまたはdCAPSマーカー (Michaels and Amasino 1998, The Plant Journal 14(3) 381-385; Neff et al. 1998, The Plant Journal 14(3) 387-392) に変換した。この変換により、上記PCRマーカーが得られた。

【0021】これらのPCRマーカーのうち、PCRマーカーR1877 EcoRI、G291 MspI (SEQ ID NO:22)、R2303 BslI (SEQ ID NO:23) およびS12564 Tsp509I (SEQ ID NO:26) からなる群と、PCRマーカーC1361 MwoI (SEQ ID NO:20)、S10019 BstUI (SEQ ID NO:24)、G4003 HindIII (SEQ ID NO:19)、S10602 KpnI (SEQ ID NO:25)、およびG2155 MwoI (SEQ ID NO:21) からなる群とは、第10染色体上でRf-1遺伝子座を挟んで反対側に存在する。したがって、本発明の好ましい態様としては、(a)PCRマーカーR1877 EcoRI、G291 MspI、R2303 BslIおよびS12564 Tsp509Iからなる群から選択される少なくとも1個のPCRマーカー、および(b) PCRマーカーC1361MwoI、S10019 BstUI、G4003 HindIII、S10602 KpnI、およびG2155 MwoI からなる群から選択される、各々少なくとも1個のPCRマーカーによりRf-1連鎖バンドを検出することにより、Rf-1遺伝子の存在を検出する。その際、上記(a)の群からRf-1遺伝子に最も近いマーカーとして、少なくともPCRマーカーS12564 Tsp509Iおよび上記(b)の群から少なくともC1361 MwoIを使用することが好ましい。被検定イネのゲノム中に、(a)のPCRマーカーによるRf-1連鎖バンドと(b)のPCRマーカーによるRf-1連鎖バンドの両方が検出されれば、そのイネがRf-1遺伝子を有する可能性を極めて高い確率で推定することができる。

【0022】本発明の別の態様においては、上記(a)の群から少なくとも二つのPCRマーカー、及び(b)の群から少なくとも二つのPCRマーカーによりRf-1連鎖バンドを検出する。例えば、(a)及び(b)の群のマーカーのうち、図1に示す遺伝子地図において、Rf-1遺伝子により近いマーカーによりRf-1連鎖バンドが検出され、それよりRf-1遺伝子から遠いマーカーによりRf-1連鎖バンドが検出されないイネ個体を選抜することにより、Rf-1遺伝子を有するが、不要な遺伝子領域をできるだけ含まないイネを選抜することが可能である。この場合も、(a)及

び(b)の各群のマーカーのうち少なくとも一つは、それぞれPCRマーカーS12564 Tsp509IおよびC1361 MwoIであることが好ましい。すなわち、2種のPCRマーカー座S12564 Tsp509IとC1361 MwoIは、マーカー座間距離にして0.3 cMしか離れていない。この性質を利用することにより、Rf-1遺伝子ドナー親から導入する染色体領域を1 cM程度に狭めることができる。その結果、ドナー親のRf-1遺伝子近傍に存在する可能性がある劣悪遺伝子が回復系統に導入される可能性を最小限に抑えることができる。

【0023】プライマー

本発明は別の観点において、上記PCRマーカーを増幅するための下記プライマー対も提供する。これらのプライマー対も、実施例1の記載のようにして得られたものである。

(1) プライマー対1: PCRマーカーR1877 EcoRIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の塩基配列を有する。

(2) プライマー対2: G4003 HindIIIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4の塩基配列を有する。

(3) プライマー対3: C1361 MwoIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:6の塩基配列を有する。

(4) プライマー対4: G2155 MwoIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8の塩基配列を有する。

(5) プライマー対5: G291 MspIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:10の塩基配列を有する。

(6) プライマー対6: R2303 BslIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12の塩基配列を有する。

(7) プライマー対7: S10019 BstUIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14の塩基配列を有する。

(8) プライマー対8: S10602 KpnIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:16の塩基配列を有する。

(9) プライマー対9: S12564 Tsp509Iを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18の塩基配列を有する。

【0024】これらのプライマー対をそれぞれ用いることにより、それぞれ対応するPCRマーカーをイネゲノムから増幅して検出することができる。さらに、これらの特定の塩基配列を含む若干長い塩基配列、あるいはこれら特定の塩基配列より若干短い塩基配列もプライマーとして使用することは、本発明の範囲に含まれる。

【0025】Rf-1遺伝子の検出

本発明の方法により、被検定イネゲノム中のRf-1遺伝子を検出するには、上記本発明のプライマーを用いて、被

検定イネゲノムから上記PCRマーカーのいずれかをPCRで増幅させ、ポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型(PCR-RFLP)法で検出する。

【0026】PCR-RFLP法は、比較する品種系統間において、PCRにより増幅したDNA断片配列中の制限酵素認識部位に多型が存在する場合に、その制限酵素による切断パターンからいずれの型であるかを簡便に決定する方法である(D. E. Harry, et al., Theor Appl Genet (1998) 97:327-336)。

【0027】PCRの鋳型として使用する被検定イネゲノムのDNAは、Edwardsら(Nucleic Acids Res. 8(6): 1349, 1991)の方法で簡易に抽出することができる。より好ましくは、標準的な方法により精製したDNAを用いるのがよい。CTAB法(Murray M. G., et al., Nucleic Acids Res. 8(19):4321-5, 1980)は、特に好ましい抽出法である。PCRを行うための鋳型として使用するDNAの濃度は、終濃度で0.5ng/μlが好ましい。

【0028】PCRの方法はよく知られている。例えば、鋳型として使用するゲノムDNA50ng、dNTP各200μM、ExTaq™(TAKARA)5Uを使用し、例えば、94℃にて2分を1サイ 20
クル行った後、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サイクルとして30サイクル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル行うことにより行うことができる。ある *

* いは、94℃にて2分を1サイクル行った後、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとして30サイクル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル行うことにより行うこともできる。あるいは、別の態様においては、94℃にて2分を1サイクル行った後、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとして35サイクル行い、最後に72℃にて2分を1サイクル行うことにより行うこともできる。

【0029】得られたPCR産物を、制限酵素断片長多型に関して調べるため、それぞれのPCRマーカーに存在する制限部位に対応する制限酵素で切断する。この切断は、用いる制限酵素の推奨反応温度で数時間〜一昼夜インキュベーションすることにより行う。制限酵素で切断したそれぞれの増幅PCRサンプルは、例えば約0.7%ないし2%アガロースゲルあるいは約3%のMetaPhor™アガロースゲルで電気泳動することにより解析する。例えば、ゲルをエチジウムブロマイド中紫外線下で可視化する。

【0030】可視化されたゲル上に、使用したプライマー対に応じて、次のようなバンドが存在するか確認する。

【0031】

【表1】

検出されるバンドの
おおよそのサイズ(bp)

プライマー対1によるマーカー1の検出(R1877 EcoRI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合: 1500及び1700

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合: 1500、1700及び3200

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合: 3200

プライマー対2によるマーカー2の検出(G4003 HindIII)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合: 362

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合: 95、267 及び362

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合: 95及び267

プライマー対3によるマーカー3の検出(C1361 MwoI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合: 50及び107

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合: 25、50、79及び107

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合: 25、50及び79

プライマー対4によるマーカー4の検出(G2155 MwoI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合: 25、27及び78

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合: 25、27、78及び105

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合: 25及び105

プライマー対5によるマーカー5の検出(G291 MspI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合: 25、49及び55

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合: 25、49、55及び104

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25及び104

プライマー対6によるマーカー6の検出(R2303 BslI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 238、655 及び679

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 238、655、679
及び1334

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 238 及び1334

プライマー対7によるマーカー7の検出(S10019 BstUI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 130、218 及び244

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 130、218、244
及び462

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 130 及び462

プライマー対8によるマーカー8の検出(S10602 KpnI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 724

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 117、607 及び724

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 117 及び607

プライマー対9によるマーカー9の検出(S12564 Tsp509I)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 41及び117

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 26、41、91及び117

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 26、41及び91

【0032】

【発明の効果】(1) 本発明の方法は、PCR-RFLP法を用い、検出しようとするマーカーのDNAをPCRにより増幅するため、サザンブロット解析を行わずに、短時間で簡便に検出することができる。サザンブロット解析を行うRFLP法と比較して、PCR-RFLP法において使用するDNAの量は数ナノグラム程度と極めて少量でもよいという利点もある。また、使用するDNAの精製度は、それほど高くなくてもよく、DNAの粗抽出液をそのまま使用することもできる。本発明においては、検出するPCRマーカーの存在をより確実に調べるため、PCR-RFLP法と配列決定とを組み合わせ使用してもよい。

【0033】(2) 本発明のPCRマーカーは、全て共優性マーカーである。共優性マーカーとは、ヘテロ個体と優性ホモ個体を識別することができるマーカーのことをいう。ヘテロ遺伝子型個体同士を交配して得られた交雑体の遺伝子型分離比を検出する場合、優性遺伝子を保有しているか否かのみを識別することができるマーカーである優性マーカーを使用したのでは、優性形質を有する個体と劣性形質を有する個体とを3：1の比率で区別することしかできないのに対して、共優性マーカーを使用する場合には、優性ホモ個体：ヘテロ個体：劣性ホモ個体を1：2：1の比率で検出することができる。したがって、本発明で開示された9種類の共優性マーカーのうち、Rf-1遺伝子座を挟むように存在する2種の共優性マーカーを使用して、その遺伝子型を識別することにより、導入す

る遺伝子であるRf-1遺伝子の遺伝子型を、ホモかヘテロか（すなわち、Rf-1/Rf-1、Rf-1/rf-1、またはrf-1/rf-1のいずれであるか）まで正確に識別することができる。

【0034】例えば、PCRマーカーS12564 Tsp509IとC1361 MwoIを用いる検定を例に説明すると、Rf-1遺伝子座の遺伝子型がヘテロである場合には、Rf-1遺伝子は制限酵素Tsp509Iで切断されないS12564マーカー領域および制限酵素MwoIで切断されないC1361マーカー領域と連鎖しており、もう一方のアリル上に存在するrf-1遺伝子は制限酵素Tsp509Iで切断されるS12564 Tsp509Iマーカーおよび制限酵素MwoIで切断されるC1361 MwoIマーカーと連鎖している。その結果、それぞれのマーカーについてPCRを行うことにより、S12564マーカーについては制限酵素Tsp509I部位に多型を有する二種類のPCR生成物が増幅され、そしてC1361マーカー領域については制限酵素MwoI部位に多型を有する二種類のPCR生成物が増幅される。それぞれの二種類ずつのPCR生成物を対応する制限酵素を用いて切断することにより、ホモ型の場合と比較して異なる制限酵素断片パターンが示される。

【0035】(3) PCRマーカー座S12564 Tsp509IとC1361 MwoIとは、第10染色体上でRf-1遺伝子座を挟むように存在し、かつPCRマーカー座S12564 Tsp509IおよびC1361 MwoIとRf-1遺伝子との遺伝距離が、それぞれ0.1 cM（約30 kbpsに相当する）および0.2 cM（約60 kbpsに相当する）と近接する。減数分裂時に1個所で乗り換えが

起こるとその周辺では乗り換えが生じにくくなるキアズマ干渉を考慮すると、0.3cMのマーカー座間距離しか離れていない両マーカー座間で二重乗り換えが起こる可能性はほとんど考えられない。したがって、両マーカー座の遺伝子型を調査することにより、その間に位置するRf-1遺伝子座の遺伝子型を正確に推定できることが示される。

【0036】なお、本明細書において、遺伝距離はcM（センチモルガン）を単位として記載する。1cMとは、組換え率が1%である遺伝的距離、すなわち、全配偶子の1%が2遺伝子座間において組換えを生じるような遺伝的距離である。組換えを起こす確率は種ごとに大きく異なるため、1 cMに対応する塩基対数は種ごとに異なる。本発明で使用するイネの場合には、染色体上の位置によっても異なるが、平均すると、1 cMはDNAの約300 kbpsに相当することが知られている。

【0037】(4) 前述したように、本発明に開示するRf-1遺伝子座と密接に連鎖する2種のPCRマーカーS12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座は、マーカー座間距離にして0.3 cMしか離れていない。この性質を利用することにより、Rf-1遺伝子ドナー親から導入する染色体領域を1 cM程度にすることができる。その結果、ドナー親のRf-1遺伝子近傍に劣悪遺伝子が存在しても、Rf-1遺伝子と同時に導入される劣悪遺伝子を効率よく識別することができるため、そのような劣悪遺伝子が回復系統に導入されてしまう可能性を非常に低くすることができる。したがって、本発明のPCRマーカーS12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座とを利用することにより、30 cM以上の地図距離を有する従来のマーカー座G291座およびG127座を使用する場合と比較して、劣悪遺伝子が導入される可能性を1/30以下に減少することができる。

【0038】(5) 本発明の別の態様においては、本発明のPCRマーカーは、ジャポニカ米とインディカ米とを区別するために使用することもできる。上述したように、本発明のPCRマーカーは、ジャポニカ米とインディカ米との間で制限酵素部位の配列に塩基多型が存在することを利用して、両種を識別することができるマーカーである。例えば、種籾の中にジャポニカ米とインディカ米が混在すると、栽培した結果所望の品種の米を収穫することができなくなるなど、ジャポニカ米とインディカ米とを区別することは重要になる。本発明の方法では、数ナノグラム程度のDNAを用いてPCRマーカーの増幅を行うことができるため、種籾1粒ごとに識別することができる。

【0039】

【実施例】本発明を以下の実施例において説明するが、これらは本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するためのものではない。

【0040】実施例1 Rf-1 遺伝子座周辺RFLPマーカーのPCRマーカー化

本実施例においては、Rf-1遺伝子座周辺RFLPマーカー9個（R1877、G291、R2303、S12564、C1361、S10019、G4003、S10602、G2155）をPCRマーカー化した。

【0041】(1) 材料および方法

Rf-1遺伝子座周辺RFLPマーカー9個（R1877、G291、R2303、S12564、C1361、S10019、G4003、S10602、G2155）を農林水産省農業生物資源研究所から購入し、ベクター内の挿入塩基配列を決定した後、以下の手順で実験を行った。なお、本文中のイネ品種のうち、あそみのり、コシヒカリおよび日本晴はジャポニカ米であり、IR24およびKasalathはインディカ米である。

【0042】(2) あそみのりゲノミク 라이브 ラリーの作製

あそみのり緑葉から、CTAB法によりトータルDNAを抽出した。MboIで部分消化後、NaCl密度勾配遠心（6〜20%直線勾配、20℃、37000 rpm、4時間、全容量12ml）によりサイズ分画を行った。各分画（約0.5 ml）の一部を電気泳動にかけ、15〜20kbのDNAを含む分画を選抜・精製した。ライブラリーの作製は、Lambda DASH II (Stratagene) をベクターに用いて、付属プロドコールに準拠して行った。パッケージングには、Giga Pack III Gold (Stratagene) を用いた。パッケージング後、SM Buffer 500 μl およびクロロフォルム 20 μl を添加した。遠心後の上清にクロロフォルム 20 μl を添加し、ライブラリー溶液とした。

【0043】ライブラリー溶液の50倍希釈液 5 μl を用いて、XL-1 Blue MRA (P2) に感染させた結果、83個のプラークが出現した。ライブラリーあたりでは、 4.15×10^5 pfu となり、平均挿入断片長を 20 kb とすると、 8.3×10^9 bp をカバーする計算になる。イネゲノム (4×10^8 bp) に対して十分な大きさのライブラリーであると考えられた。

【0044】(3) R1877、C1361 および G4003 対応ゲノミク クローンの単離

C1361 および G4003 については、RFLP マーカープローブを含むプラスミドを単離した後、制限酵素処理・電気泳動により、RFLP マーカープローブ部分を分離し、DNA回収フィルター (Takara SUPREC-01) を用いて目的のDNAを回収した。R1877については、マーカープローブ両端部に対してプライマーを設計し、あそみのりトータルDNAをテンプレートにPCRを行い、産物を電気泳動後、前述の方法で回収した。回収したDNAは、rediprime DNA labelling system (Amersham Pharmacia) を用いてラベルし、ライブラリースクリーニング用プローブとした。なお、PCRは常法により行った（以下、同様）。

【0045】ライブラリーのスクリーニングは、プラークをHybond-N+ (Amersham Pharmacia) にプロットした後、常法により行った。1stスクリーニング後、陽性プラーク周辺を打ち抜き、SMバッファーに懸濁し、2ndスクリーニングに供試した。2ndスクリーニング後、陽性

ブランクを打ち抜き、さらに3rdスクリーニングを行い、単一ブランクを分離した。

【0046】分離した目的ブランクをSMバッファーに懸濁後、プレートライセート法によりファージを一次増殖した。得られたファージ増殖液を用いて、振とう培養法により二次増殖を行った後、Lambda starter kit (QIAGEN)を用いてファージDNAを精製した。

【0047】各マーカーについて、8枚のプレートを用いて1stスクリーニングを行った。プレート1枚につきライブラリー溶液を10 μ l使用した。3rdスクリーニングまで行った結果、R1877、C1361およびG4003対応ゲノミッククローンを、それぞれ、4個、3個および3個単離した。

【0048】(4) R1877のPCRマーカー化
単離したゲノミッククローンを解析し、RFLPの原因部位、即ち、IR24には存在しあそみのりには存在しないEcoRI部位を同定することにより、PCRマーカー化を行った。

【0049】単離した4クローンについて以下の解析を行った。まず、T3およびT7プライマーを用いて、各クローンの挿入断片の両末端の塩基配列を明らかにした。

【0050】つぎに、マーカープローブ両端部に対して外向きのプライマーを設計し、T3およびT7プライマーと組み合わせ(合計4プライマー組合せ)、各クローンをテンプレートにPCRを行った。

【0051】また、各クローンをNotIおよびEcoRIで消化した後、電気泳動することにより、挿入断片長および各EcoRI断片長を推定した。これらの解析の結果、各クローンの位置関係を明らかにすることができた。RFLP解析ではマーカープローブR1877により日本晴では20 kb、Kasalathでは6.4 kbのEcoRI断片が検出されること(ftp://ftp.staff.or.jp/pub/geneticmap98/parentsouthern/chr10/R1877.JPG)と併せ考えることにより、IR24には存在しあそみのりには存在しないEcoRI部位のおおよその位置が推定できた。そこで、その周辺を増幅するように設計したプライマー組合せ(SEQ ID NO:1×SEQ ID NO:2)を用いて、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてゲノミックPCRを行った。得られたPCR産物をEcoRI処理した後、0.7%アガロースゲルで電気泳動した。その結果、あそみのり-IR24間で期待通りの多型が観察された。すなわち、PCR産物(約3200bp)のEcoRI処理により、IR24では1500bpと1700bpとに切断されるのに対し、あそみのりでは切断されなかった。あそみのり-IR24のRIL (Recombinant Inbred Line)を用いてこのPCRマーカーをマッピングした結果、RFLPマーカー座R1877と同一領域に位置づけられ、RFLPマーカーR1877がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはR1877 EcoRIと命名した。

【0052】(5) G4003のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンを解析し、RFLPの原因部位、即ち、あそみのりには存在しIR24には存在しないHindIII部位を同定することにより、PCRマーカー化を行った。

【0053】R1877と同様の解析を行い、単離した3クローンの位置関係を明らかにした。RFLP解析ではマーカープローブG4003により日本晴では3kb、Kasalathでは10kbのHindIII断片が検出されること(ftp://ftp.staff.or.jp/pub/geneticmap98/parentsouthern/chr10/R1877.JPG)と併せ考えることにより、あそみのりには存在しIR24には存在しないHindIII部位が、2個の候補部位のいずれかであると推定された。そこで、各HindIII部位周辺を増幅するように設計したプライマー組合せを用いて、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルの条件で、ゲノミックPCRを行った。得られたPCR産物をHindIII処理後、2%アガロースゲルで電気泳動したところ、マーカープローブ内部のHindIII部位が多型部位であることが示された。すなわち、PCR産物(362bp)のHindIII処理により、あそみのりでは95bpと267bpとに切断されるのに対し、IR24では切断されなかった。多型部位を増幅するためのプライマーはSEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4である。マッピングの結果、RFLPマーカーG4003がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはG4003 HindIII (SEQ ID NO:19)と命名した。

【0054】(6) C1361のPCRマーカー化
単離したゲノミッククローンの塩基配列情報に基づいてプライマーを設計した。あそみのり、コシヒカリ、KasalathおよびIR24のトータルDNAをテンプレートにPCRを行い、産物を電気泳動後、既述の方法で回収した。回収したDNAをテンプレートに用いて、ABI Model 310により各品種の塩基配列を解読し、多型作出に利用可能な変異を探索した。

【0055】R1877と同様の解析を行い、単離した3クローンのおおよその位置関係を明らかにすることはできなかった。しかし、C1361マーカー周辺にはPCR増幅しにくい領域や塩基配列を解読できない領域が存在することが明らかになり、RFLP原因部位を同定することは困難であると考えられた。そこで、比較的長いPCR産物(2.7kb)が得られる領域に着目し、dCAPS化を試みることにした。あそみのり、コシヒカリ、Kasalath、IR24を用いて、同領域のゲノミックPCR産物の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間で多型を示す部位を6ヶ所見出すことができた。そのうちのひとつについて、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:6を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をMwoI処理後、3%MetaPhorTMアガロースで電気泳動することにより解析した。あそみのりでは2箇所切断され、約25bp、50b

p、79bpのバンドが観察され、IR24では1箇所で切断され、約50bp、107bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーC1361がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはC1361 MwoI (SEQ ID NO:20) と命名した。

【0056】(7) G2155のPCRマーカー化

マーカープローブ両端部に対してプライマーを設計し、あそみのり、コシヒカリ、IR24およびIL216（戻し交雑によりコシヒカリにRf-1遺伝子を導入した系統、遺伝子型はRf-1/Rf-1）のトータルDNAをテンプレートにPCRを行なった。PCR産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

【0057】供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、Rf-1遺伝子保有品種・系統（IR24およびIL216）- Rf-1遺伝子非保有品種（あそみのりおよびコシヒカリ）間の変異が3ヶ所見出された。そのうちのひとつを利用して、dCAPS化を行なった。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行なった。得られたPCR産物をMwoI処理後、3%MetaPhorTM アガロースで電気泳動することにより解析した。あそみのりでは1箇所切断され、約25bp、105bpのバンドが観察され、IR24では2箇所切断され、約25bp、27bp、78bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーG2155がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはG2155 MwoI (SEQ ID NO:21) と命名した。

【0058】(8) G291のPCRマーカー化

マーカープローブ内部配列に対してプライマーを設計し、種々のプライマー組合わせでPCRを行い、期待される大きさの増幅産物が得られるプライマー組合わせを探索した。探索により見出したプライマー組合わせで、あそみのり、コシヒカリ、IR24およびIL216のトータルDNAをテンプレートにPCRを行なった。PCR産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

【0059】マーカープローブ配列に対して設計したプライマーを用いて、供試品種のゲノミックPCRを行い、産物の塩基配列を比較した。その結果、Rf-1遺伝子保有品種・系統（IR24およびIL216）- Rf-1遺伝子非保有品種（あそみのりおよびコシヒカリ）間の変異が4ヶ所見出された。そのうちのひとつを利用して、dCAPS化を行なった。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:10を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行なった。得られたPCR産物をMspI処理後、3%MetaPhorTM アガロースで電気泳動することにより解析した。Rf-1遺伝子保有品種・系統では2箇所切断され、約25bp、49bp、55bpのバンドが観察され、Rf-1遺伝子非保有品種では1箇所切断され、約25bp、104bpのバンドが

観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーG291がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはG291 MspI (SEQ ID NO:22) と命名した。

【0060】(9) R2303のPCRマーカー化

マーカープローブ内部配列に対してプライマーを設計し、あそみのり、IR24およびKasalathのトータルDNAをテンプレートにPCRを行なった。産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

【0061】供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間の変異が見出された。この変異は、BslI認識部位に生じていたので、そのままCAPSマーカーとした。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて2分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてPCRを行なった。得られたPCR産物をBslI処理後、2%アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所切断され、約238bp、1334bpのバンドが観察され、インディカ米では2箇所切断され、約238bp、655bp、679bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーR2303がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはR2303 BslI (SEQ ID NO:23) と命名した。

【0062】(10) S10019のPCRマーカー化

S10019のPCRマーカー化は、R2303のPCRマーカー化の方法にしたがって行った。

【0063】供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間の変異が見出された。この変異は、BstUI認識部位に生じていたので、そのままCAPSマーカーとした。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてPCRを行なった。得られたPCR産物をBstUI処理後、2%アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所切断され、約130bp、462bpのバンドが観察され、インディカ米では2箇所切断され、約130bp、218bp、244bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーS10019がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはBstUI (SEQ ID NO:24) と命名した。

【0064】(11) S10602のPCRマーカー化

S10602のPCRマーカー化は、R2303のPCRマーカー化の方法にしたがって行った。

【0065】供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間の変異が見出された。その変異を利用して、CAPS化を行なった。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:16を用い、94℃にて1分、58℃にて1分、72℃にて1分を1サイクルとし33サイクルのPCR条件にてPCRを行なった。得られたPCR産物をKpnI処理後、2%アガロースで電気泳動す

ることにより解析した。ジャポニカ米では1箇所で切断され、約117bp、607bp のバンドが観察され、インディカ米では切断されず、724bp のバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーS10602がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはS10602 KpnI (SEQ ID NO:25) と命名した。

【0066】(12) S12564のPCRマーカー化
S12564のPCRマーカー化は、R2303のPCRマーカー化の方法にしたがって行った。

【0067】供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間の変異が見出された。その変異を利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18を用い、94℃にて30秒、58℃にて30秒、72℃にて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をTsp509I処理後、3%MetaPhor™ アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では2箇所で切断され、26bp、41bp、91bpのバンドが観察され、インディカ米では1箇所切断され、41bp、117bp のバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーS12564がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはTsp509I (SEQ ID NO:26) と命名した。

【0068】実施例2 Rf-1遺伝子座のマッピング
MSコシヒカリにMS-FRコシヒカリの花粉をかけて作成したF1集団1042個体の幼苗からDNAを抽出し、分析に供試 *

*した。ここで、MSコシヒカリとは、細胞質をBT型雄性不稔細胞質に置換したコシヒカリである(世代:BC10F1)。また、MS-FRコシヒカリとは、IR8に由来するRf-1遺伝子をMSコシヒカリに導入した系統である(Rf-1遺伝子座ヘテロ)。

【0069】まず、Rf-1遺伝子座を挟むと考えられる2個のマーカー座R1877 EcoRIおよびG2155 MwoIにおける各個体の遺伝子型を調査した。R1877 EcoRI座またはG2155 MwoI座に関してジャポニカ米型ホモ個体を、これら2マーカー座間での組換え体とみなした。つぎに、各組換え体について、G291 MspI座、R2303 BslI座、S12564 Tsp509I座、C1361 MwoI座、S10019 BstUI座、G4003 HindIII座およびS10602 KpnI座の遺伝子型を調査し、組換え位置を同定した。

【0070】R1877 EcoRI座およびG2155 MwoI座に関する遺伝子型調査の結果、46個体がRf-1遺伝子座付近での組換え体であることが明らかになった。これら組換え体について、Rf-1遺伝子座近傍マーカー座の遺伝子型を調査した結果を表2に示す。上記交配において、BT型雄性不稔細胞質を持つ個体では、Rf-1遺伝子をもつ花粉のみが受精能力を持つとの報告(C. Shinjyo, JAPAN. J. GENETICS Vol. 44, No. 3:149-156(1969))に基づいて、Rf-1遺伝子座を詳細連鎖地図上に位置づけることができた(図1)。

【0071】

【表2】

表2 Rf-1 座近傍組換え個体のマーカー座遺伝子型

Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
R1877 EcoRI	J	J	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
G291 MspI	H	J	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R2303 BslI	H	H	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S12564 Tsp509I	H	H	H	H	H	H	H	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
C1361 MwoI	H	H	H	H	H	H	H	J	H	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S10019 BstUI	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H
G4003 HindIII	H	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
S10602 KpnI	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
G2155 MwoI	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J

24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J

J コシヒカリ型ホモ

H コシヒカリ型/MS-FRコシヒカリ型ヘテロ

【0072】本発明において、Rf-1遺伝子座と密接に連鎖するマーカー座の遺伝子型を検定するために、Rf-1遺伝子座を挟む位置関係にある新規の共優性PCRマーカーS12564 Tsp509IとC1361 MwoIを含む、9個の新規の共優性PCRマーカーを開発した。これらの新規の共優性PCRマーカーによりRf-1遺伝子座の遺伝子型を、簡便かつ正確に推定する方法を提供することができる。本発明のPCRマ

ーカーを使用すると、ジャポニカ米-ジャポニカハイブリッドライスの育成に利用されているBT型雄性不稔細胞質に対するRf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施できた。したがって、本発明のPCRマーカーは効率的にハイブリッドライスの育成に利用することができる。さらに、本発明の方法では、遺伝子型をDNA配列から直接的に検出する

ため、環境要因の影響を受けることなく、Rf-1遺伝子座 * 【0073】
の遺伝子型を決定することができる。 * 【配列表】

<110> JAPAN TOBACCO INC.
<120> A method for genotyping the locus which is involved in restoration of the rice BT type cytoplasmic male sterility.
<130> 991698
<160> 26
<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<223> Oligonucleotide primer for amplification of R1877 EcoRI marker sequence.
<400> 1
cattcctgct tccatgaaa cgtc 24
<210> 2
<211> 33
<212> DNA
<213> artificial sequence
<223> Oligonucleotide primer for amplification of R1877 EcoRI marker sequence.
<400> 2
ctctttctgt atacttgagc ttgacatct gac 33
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence
<223> Oligonucleotide primer for amplification of G4003 HindIII marker sequence.
<400> 3
gatcgacgag tacctgaacg 20
<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<223> Oligonucleotide primer for amplification of G4003 HindIII marker sequence.
<400> 4
aatagttgga ttgtcctcaa aggg 24
<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial sequence
<223> Oligonucleotide primer for amplification of C1361 MwoI marker sequence.
<400> 5
aaagcaaccg acttcagtgg catcacc 27
<210> 6
<211> 24
<212> DNA

23
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of C1361 MwoI marker sequence.
 <400> 6
 ctggacttca ttccctgca gagc 24
 <210> 7
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of G2155 MwoI marker sequence.
 <400> 7
 gaccaccaat taactgatta agctggc 27
 <210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of G2155 MwoI marker sequence.
 <400> 8
 tttctggctc caataatcag ctgtagc 27
 <210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of G291 MspI marker sequence.
 <400> 9
 ctgctgcagc aagctgcacc gaaccgg 27
 <210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of G291 MspI marker sequence.
 <400> 10
 acattttttc ttccgaaact tccg 24
 <210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of R2303 BslI marker sequence.
 <400> 11
 atggaaagat acactagaat gagc 24
 <210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

25
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of R2303 BslI marker sequence.
 <400> 12
 atcttatata gtggcaggaa agcc 24
 <210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of S10019 BstUI marker sequence.
 <400> 13
 aacaatctta tcctgcacag actg 24
 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of S10019 BstUI marker sequence.
 <400> 14
 gtcacataga agcagatggg ttcc 24
 <210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of S10602 KpnI marker sequence.
 <400> 15
 agctgttgag agttctatgc cacc 24
 <210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of S10602 KpnI marker sequence.
 <400> 16
 tagccatgca acaagatgtc atac 24
 <210> 17
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of S12564 Tsp509I marker sequence.
 <400> 17
 ctagttagac cgaataactg aggttc 26
 <210> 18
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <223> Oligonucleotide primer for amplification of S12564 Tsp509I marker sequence.

27

28

<400> 18

tttgtgggtt tgtggcattg agaaaat

27

<210> 19

<211> 2240

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker G4003 HindIII

<400> 19

gcggccgctc cggaagtcg agcgagtaga cggccctgac gccgtacgcg tcggcgagcc 60
 gcagcgcgct ctctggcggt gtgaaggaca gcccggtcag cgtcgcgcgg cgccgcccgt 120
 tgatcgctac cggcgcgctg ctccgcagca ggtacgcctg cgtcacgttg atcgacgagt 180
 acctgaacga tccctgtggg ttcggcctcg ccgctccggc actcaggttc cacctgcccc 240
 atgcaaaaaa ccaaaaccca aaagcttaat gcgaataata catcattcca cgtattttaa 300
 aaaataattt ataggtaaaa tttttataat gtatttttagc gacgtaaatg tcaatgctga 360
 gaaataaacg ataatacttt aaatgaagtt ctaaaattta aattttggca tcggttgatg 420
 ttggataaag aaaacgatgg aggctagtaa tttttcttct tttttaagta tctagattgt 480
 catatattga atttttcagt ttttcatccc ttgaggaca atccaactat tattttcctt 540
 ttcttatgta aaaggttgaa caacatattc aaacataaaa aaataaaatt aaatgaaata 600
 aatttacaat tcataaaatt tacagaattt atgttaagaa aatattcaaa cttagataat 660
 aataaagcaa caaaatcgta ctaaaaagaa gtataattgt acattgtata ctactactcc 720
 tacaatttta gacttagaat ttttaatttc ctgaaatcta gtaatgcat tttttcttt 780
 ctagtgaac cagacagtaa gttaactcg aaactataa gctaattgac gaagtccggc 840
 aattcactcg tacctgacgg agegagcttg gttcatggag aaggacttgt cgaactggtc 900
 ctggggaggg tcggggagcg ggccggaggc ccgcccccg gagttggagt agcggaggac 960
 ggcgacgccg gcgacgcggc gccacacggt gtcgttcacc atgcgcgcgc tggcgacgac 1020
 gtagtagtcg gagctcgcgt tctggtcggt ggtgacgagg aaggagtagg actggccgac 1080
 gtggacgtcc aggttggtgt agttctgctg cgtcgtgtag gagccctccg tctccaccag 1140
 caccatgttg tgccctgga tctgaagtt gaggtcgtc gacgtcccca cgttgtgcac 1200
 tcggatcctg tacgtcttgc ctgtgtcccc acaccgacgt cgcgcacaca cgcgcaaaag 1260
 ataatagact cattgtaagt aggtagtaac cttctccgtt tcatattata aatcgtttga 1320
 ttatattttt gttagttaaa cttctttaag ttttttttct ataaacttaa ttaaatctaa 1380
 agaattttta taaaaaaat caaacgactt ataataaaa atggatggag tagttgcatc 1440
 aatttgtgga tgaagcaaac aagattatat ctttttcatg agggtgaaag tattcagtga 1500
 acaattcgtc agtttcaagt tcatgaaat cggacagggt ctctgaaagt ctgtattttt 1560
 ggtactgttg gattgactac tctggcttct gttgtcacat cttttgtatc ctagtttcgg 1620
 taaaaaaat tttggcattt ttactctat cgttgatctg ttaactgaa accattgcat 1680
 gatatactac tagcagacaa aactggtgaa aattcacgag aatgaacttt ttgtcagtta 1740
 agcattagcg gacagcttca gtaagcagag caggctgcct taaggcttaa agcactatct 1800
 tccacaacac ttgtctctac aatcaaattc caaatttact atcacaaaaa gcgaaggaac 1860
 taactaaacc ttactctac tagtactact gctatgacta tgaaacaaga ttccaatcca 1920
 aagaaaacac agtgctcgat cagcatgata aaagcaacga aacctgctca tccagctgcc 1980
 aaaatgccac ccactgact ctacgtacgt actacgtatt gacgctgtaa aaaactagcc 2040
 gtagtacaga gaagaggacc caaagtttcg tcaaaaaatt tattttaccc ggatccacat 2100
 tgatggtctc gtactcgatg ccggccggga caaggctgtc gttgtacctg tacgggccct 2160
 tgccgttaat cagcacgccg tccggcatcc cgaggctcct gccactgtcc agcatcttcc 2220
 tcagatcctg caacgaattc

2240

<210> 20

<211> 2601

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

29

30

<223> PCR marker C1361 MwoI

<400> 20

tcttgctgag atccaagttg cggtaacttt gcccttttct tttttcttc tcttctgaat 60
 tttttcatgg tttttgggag agattttcgt aacttgatta cagttctagg aaaaggccac 120
 cttgttcaaa cagggtttc ttgaaaggga tcaatttgct aggagtacat gattctaaaa 180
 gcgatttcga aataaaacac agttctcgat ctcatacctg aaaacaaaag gcccatactg 240
 tgtaaacgtg gattatgctt ctgttaaatg ggatatttgt acaaaattga cgccaaccac 300
 ctataaacag attgtgagct tttatcttag taaaataaaa tgtgacattc tactcagtg 360
 tcagtgatcc gatgtcgtct cttctgcgta caacttctaa cagccgtttt cggtagtaca 420
 aactagcgaa acacaaaaa cgcagcattt gaggttctga atacgctgaa attgttagaa 480
 tcaaccacga aacaaaaatc attgttcaga aacgttgcaa cgagataaaa cacaagaact 540
 tgttttaaca aagcatacgg acagtacata tacggttaca acaccagtc tttatacagt 600
 tctgctggag ttccatctac tggctgtcat tgtatctcag gacagacagg ttaacatagg 660
 tacaacacaa ttacaggcta aaccgaagcg aactacactg tcagcatctc taacagtatc 720
 gtcaagcaag cttatttaca gctgctctag taaatttaca acgtccctgg cagaatccct 780
 ctctttctg gcagcgacga ggcacggtcc atggccttag caggacatct caccgcgtag 840
 ctgcatagaa agcaaccgac ttcagtggaa tcacctctg ctcttgcaaa aaagttgggt 900
 cgatcaatca cgcgtttaat ccaaaacaaa atgggtatta attatgctag cctatgaagc 960
 tacctcagag ttctctattt gctctgcagg gaaatgaagt ccagtggaa agttctcaag 1020
 cacctcaggg ctcttcaccc atgctttgtg tgcttcaatg gctttcagct tatagcgaaa 1080
 catctgcgat acgatctaa aattaaggat gtcgacaatt acttaacaca acaataaatt 1140
 gaagcaggtc cagttaaaga aaagtagcag cgaagaatag cactctgaag tctgaacctc 1200
 agataaagaa atggttggtt ttccagttc atctccctca acatggattc cagtacctg 1260
 gcattctggg caaaggatgg atgttatttt cttagggtgca tttttgcct ttcttctcgt 1320
 attgcttttt ccttgcttg caattttgtc tgctagcatc tcatattggc ataaaaatag 1380
 ccagtgcaca aggcaagaag tgtgaaacaa atgaaatgcc tgcaaaatta gccgtacaaa 1440
 gtcattggag gttgcagcag aatactacaa atttttaaag aagaaactat acactgtcta 1500
 tgttttgctt gaaatgaatt caaccacttt gcattatacg gtttggaatc cctggtttgt 1560
 gagaactgta attccattac aacagtgaag aagttacat aactaatgaa tggaaattag 1620
 tcaaagcct aattttttag gtttgcttta attttttat ctgtgagaaa tgctaagcat 1680
 gtcatgcgtt gctatcttca agaaatacta agaaactgca aaggcaaga atgtttgaaa 1740
 taacttacc cgttgagtt tctactgctg caggctagat ttcctgtctt gcagttgagc 1800
 aaggtagcta catccttttc aagaagcatt ggtagccac aaatatcaca agctttctca 1860
 gcagcaaggc gttctgctt acgcaactcc ctctcatag atttggtgga taagaggcca 1920
 acttgaagat tgtgtgaagt acctgtcggg gaacctgtta tgatagcttg gctattgtca 1980
 tgggcggagc tgccttgctc attcgactcc tctgaagatg cttcttgatc tgaaaatgac 2040
 ttctttcttc ttttccacg gtgtccagca tcatcaatca cgaagaaaga tccagcagag 2100
 ataggaaggt cctgatcatc agaagaccac ttctgccc aactcaattgt ataagagaag 2160
 ttgacaatgg caaagtcaga ttgctcatag gtgtcacact catccaagcc atgggagcca 2220
 tctgtccta cccaagcaca ccagatcttg ctaatctttt tacttccttt gctagcttcc 2280
 cataacctgt atgcaatatt tccatatccc aaaagatgca caggcaaact cgaacaaca 2340
 tccttttagc atacactagg aataacgaga ggaccgtcag ttccactttg gtttgacagc 2400
 acatgatctt cagatacaga agcagttcta ccattaccat gcgcatttgc accacggcgt 2460
 gtgccttttg cgccattgcg agagctagaa tcatctctca acctcgaagt cacttcagt 2520
 tcgttcgctg gaaccagagc cagctctctg gtgttctgag agctcgagtc cagcaagagc 2580
 gggctcttct cgcgcgagtt g 2601

<210> 21

<211> 1333

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

31

32

<223> PCR marker G2155 MwoI

<400> 21

```

ccctctgctt gatccagtg acatccatgg gttaggacag attagttact cagttaatta 60
agtgtgagac tggaaaaaaa tatctgacgg cagttttata agttgagtga ttgaactagt 120
gaaagttcag ttaactgtca acggctgtag atttgggatg gcagactggt ctgagtcaaa 180
atgaagcttt tactgtgcgt ggttaccagg tgcagtaaaa taatttcaga tctaatacga 240
gtaaaaaaat gtagtactat atgttaagac gagattggtc ggtcaaaatc tatctggccc 300
tttacatctc ccaaatgtta cctcagttgc aggtggtaaa aaaaaatcac tcgtttcacg 360
tgatgtcggc agatcatgga ccatgtctca aatgctgaaa ctctgaacaa tcaacaaaaa 420
aatccaaacca gatgagctgt gcaactgata attgatcatc acactatttg caactcatct 480
ttcatgtaga tggaacttca atcccgaaga aataatgaca gcaaaatgct gcgatcctga 540
agaaaggatg gcggcaaaat ggcagcgata aaaaaaaat ggttggttac tgaagaatta 600
tttgtgcagc agttgagaca gtagcaagat aagagctagc taagctagct aggtagagtt 660
ggatggaaga gtagtagtat gagatagagc atggagcgcg acaactcaag tggatgctaa 720
agtaaaagc attctcttct cttgtttgga atcagaaaaag aaaagaaaag acttgagctg 780
cttggtctgga atgtttggtt ggatcatgcg cgctctcctt agcttagctc gccaaagaaat 840
cctcgtctca tctctctcaa taattcaaag ccacgagctc tctgctcata tccagtgcga 900
cgattcccgt taatgcaaat gcattatata cagttcgaaa tgttacaatt ctgctgtttg 960
cagcaagcca gcaagtgggt tgaattgttt aatccctcgt gcatttcaac gaaattctct 1020
caciaattcg catgacttc tttcttagca caattagtaa gcagtgacaa ataaagaatt 1080
tttgaacagg atgtctttcc aaggaagggt agatttttta tgtggatagc aaggatcgcc 1140
tttcccttagc atgaagagaa tgtgatcaac tttacacctt gcttacgatt atggccttaa 1200
tttttgatac cctaaacagg agcacatcac atgcatgctg acctgagacc accaattaac 1260
tgattaagtt ggcatctcag atgcatccgt cagttacatg atcaggatgat cgatggatca 1320
actgtaggtt tca
1333

```

<210> 22

<211> 863

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker G291 MspI

<400> 22

```

cgaacaggat caaaagtaga cgacgagggc atttagaagg agaggaattg tatttgttcc 60
cggatatttaa tttttaaat tttgttcgga agtttcggaa gaaaaaatgt gctcatgagt 120
gattattggc tctgaacacc aacctctctt ttcgttgatt cttctgagg tgttgggtgt 180
tgggacacga tgcgtccgcc gacacgacac cgggttccac aatacactaa tctactcgcg 240
acaccttcat tgaactgcat ataattattt agaaagtcca ttaacacatc ttataaaacc 300
ttgttgaatc atataatcat tctataaagt ctatttgaac atcttatgaa aaaataagat 360
ctgacctagt cgttacactc tcttacattt tccattagcc taactaatc cgtgcaggaa 420

acgcccaaaa ataatagtac caatagtcca ctaatcccgt gccagaggcc gccaatgatt 480
agtgattaac caaaaaaca taatcatcat cacacgccgc taatgaccag ctctcgctta 540
gctcatccca caggcggccc ccacacgcca ctctgccat gtgggccccc ctttcacacc 600
cccaccaac cagaaaaaaa actcccccaa aaaaaaaact tttaatgctt atctcgcggc 660
agtataaaag gcgacccccc caccacaca caatcacagt cagcgaccca acccaaccgc 720
agccgaggag tcgagtcgtg tgaatttac gaaattgccc ttcgactcca ccaccaccac 780
ccaccggcga ggcgaggaga ggagaaaaat tgggaggaaa aaaaaggga aaaagaaaaa 840
gggtggagga gatttttgcg aag
863

```

<210> 23

<211> 1510

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker R2303 BslI

<400> 23

tgccatgaag acctatggaa agaatatctt cttctcactc tgtgaatggt gagtttactc 60
 tctgtaacat ttagggctag gtcgaaggaa catgaagcat tgctgattca ctccactgtg 120
 tttttttttt ctgtataggg ggaagaaaaa tcttctaca tgggcaggcc gcatgggtaa 180
 cagctggaga acaactggcg acatcgccga caactggggc aggttctact catcctctct 240
 ttaacctgt ttacatagtt cttgagtttt tcagtactga tcgtaattgc cctgttattt 300
 cagtatgaca tctcgtgcag acgaaaatga ccaatgggct gcctatgctg gacctggtgg 360
 atggaatggt aagaacttga gatgtatctg ttccataggtt gcttaacat ttgagagctt 420
 caaatgatc aacatatggt tctgctgtgc aatatcagat cctgacatgc ttgaagtggg 480
 aatggtggg atgtctgaag ctgagtaccg gtcacacttc agtatctggg cactagcaaa 540
 ggtaccatag catgttctat gtactaataa ttttctgca atgttgaact tctttgcatt 600
 tctcactgc aagttttgt tgaattgttc aggtcctct tttgatcgga tgcgatgtgc 660
 gctcaatgag ccagcagacg aagaacatac tcagcaactc ggagggtgac gctgtcaacc 720
 aaggcaagcc ttctcagttt cacatgctta gatttagcca tacctcttgg atatttcacc 780
 atactcataa tgtaactctc tgaacagata gtctaggtgt ccaaggaaaag aaagtacaat 840
 ctgacaacgg attggaggta tcccttcaat ggcttccaaa tttgcagttt ctcatgttcc 900
 cataagcctt ggcatgatca tgactaactc tgaagctgac aatactttgt gtaaatttgt 960
 cggtaggttt ggccggggcc actcagcaac aacaggaagg ctgtggtgct ctggaacagg 1020
 cagtcatacc aggcaacat cactgcacat tggctgaaca tcgggctcgc tggatcggtc 1080
 ggggtcactg ctctgatct atggcggtta aagcctttgc tttcttcaga gctcaaagta 1140
 gaacatcttc tcttcagaat tcagagtcca taacaaattt ctgtcaattg tgcagcactc 1200
 ttcgttcgcg gctcagggac agatatcagc atcgggtggcg cctcatgact gcaagatgta 1260
 tgtcttgaca ccaaactagt cagcaaagaa aagcagcaca ggtagtagc tgcctggcga 1320
 atacagctaa attgatcagg attcaggaag aaggtttgca atttgcaagg attgtagag 1380
 ctggaatgg gatgccattt ggttatgtat gtagaaataa gctgtaagcc tgtaagcgta 1440
 tatgtaatca gccgtcaaat gctggcgagt gtatttctga agtttgcaac gaaagttgca 1500
 gcaataaaaa 1510

<210> 24

<211> 1016

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker BstUI

<400> 24

tggggattct tttctttaag caatttaaca ttattgtcct aacaatatac acaatattgg 60
 tttttcttcc agtatcaaat aattctttta cttttgaaaa cacatttgca atgtgttgga 120
 aacacaatta tatcttgca ttccttttgg aaatttaate attgaaaac tgattcgcgt 180
 ttcattggctg taatcttctc ttgcgaacat cgtcttttct ttgatggttc tctgttgaga 240
 agaagagcaa ccaagtaaat tttcgaatg ttttttgggt ctttctatc accattgcag 300
 gttgtcaaaag ccatcgagaa ggccataccg attcagagag cgcaacccat tgccttgat 360
 ggcccagcaa gggaagagct gaaggccatg gaggcgcaga aggtcgagat cgaccgcacc 420
 gcggcgctcc aggtgcgcgc tgagctttgg ctggggctgg catacctcgt cgtccagact 480
 gccggcttca tgaggctcac attctgggag ctctcatggg atgtcatgga acccatctgc 540
 ttctatgtga cctccatgta cttcatggcc ggctacacct tcttctccg gaccaagaag 600
 gagccctcct tcgagggctt cttcgagagc cggttcgcg cgaagcagaa gcggttgatg 660
 cacgcccggg atttcgatct ccgcccgtat gacgagctcc ggcgagcctg tggectgccg 720
 gtggttcgga ctccgacgag cccctgcaga ccgtcgtcgt cgtcgtcgtc gtcttcgacg 780
 caggagagcc attgccattc ttactgcat tgccaatgat ctttgtgctg ttctgttctg 840
 ttgtcagaat tttttcatgc ccagtttatg ggggttaagc tagcttctcc attgtaccgt 900

35

36

tctgatgtgc g gatgatgcg atgcaaagca tagtttgttg aagagatgac aaggcagatt 960
 ttagcttgaa aacctggagg tgagaaaaaa aaatcctgat gtgtttgtgt gtgtga 1016
 <210> 25
 <211> 676
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa* L.
 <223> PCR marker S10602 KpnI
 <400> 25
 accaccttca tatgaagaaa ttaacggtgt tttcatgagg aatccaacag tcgctgaatt 60
 ggtgaaact gtggaattct tcttggctga ggtaaccaat catcacttca ccacaatgca 120
 caagtttgta gcttactact acagtacttc taataagttt tgtctgttga gattttattg 180
 ctgatttcta tgcattgtca tctttttgac aggccatcca gtcttatcgt gctgagagt 240
 aaactgagct caacctggca gctggtgact atatatgtgt ccggaaggta cggccctatc 300
 ttccatttg acatgtttct aaccataaac atatctttgc tggacttttg tgggcaagt 360
 tggtacact aaacttgtgt tcattaacct gctcaatcag gtgtcaaca atggatgggc 420
 agaaggtgaa tgcagaggga aagctggctg gtcccttac gactacatcg agaaaaggga 480
 ccgtgtgctt gcaagtaag tcgccaggt cttctaggcg ttcaatgagc catacataca 540
 taacctggt gttgtacact gtattatgat cgttcgtgat cttcaagac cctctgatca 600
 gagaaatcac aaatattctt ttgttctatt attgtcatta tcaactaccc tttgtcaaa 660
 accagtgcag cctttt 676
 <210> 26
 <211> 1059
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa* L.
 <223> PCR marker Tsp509I
 <400> 26
 gcgagatcat gaacttgatt ttctggttgc catattgggc ttgcttgta acctttaga 60
 gaaggatagc cttaataggt aagtcctca catgcttct tccatttgc caattcatat 120
 cagtgttact gttctggcag ttcttgggg tcaggactca gaaacatcca attaatgttc 180
 atgttctctt aacgactcag aaatacttta taacctctcc acagggtacg gctttcatct 240
 gccctgttgc ctgttgatct atctcagaat ccacagagtg aagagacaca gagagatgct 300
 atagactcc tctgttctgt attcttagca agtcaagggt ctagtgaagc ttctggaact 360
 atatcaccgg taattcaaaa ttctcaagt tccttttgta ttagattat atctttgtaa 420
 aactcgcat ttattacctg ctctttgttt caaaaagcag tattttattt tgcctcttag 480
 cataggtcag cagaacagtt gatcttattc agaaaacaat attttgcag taacatactg 540
 ttatctatga gatgaaaatt aatgcagtgt taataatgtc aatgataaat atttgctatc 600
 tgaatccagt ctaccaactc tagttagacc gaattactga ggttctattt caaagaataa 660
 tttagtgcac catttggtca actactatga agtaaaatgg tattcccttc tattgacatc 720
 gggttagaag tgaaaggcca tcttaatgcg atgttctcaa tgccacaaac ccacaaattt 780
 cattaacaca tacagattat tattaacata gctataaatt ggatttcag aagcttgagt 840
 tgaatttatt ttgttacaat tgaaagcact gggaacatta gcattttttt ttagttcttg 900
 gtatttgcaa ttataatgt tatacagaac tgtgtacctc acaatgcatt cattatgaca 960
 ttctatgaac catttgattg actgttgctt gtaacaaca ggatgatgag gagtcttga 1020
 tgcaaggagc acgggaagct gaaatgatga tcgtagagg 1059

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、第10染色体上でRf-1遺伝子座をマ

カーとの関係で連鎖地図上に位置づけた、遺伝子地図を表したものである。

【図1】

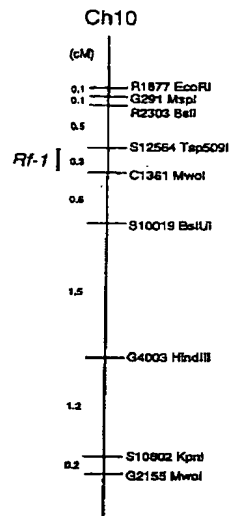


図1. Rf-1座の推定座乗位置

地図距離は1042F1個体の分離データから算出した。

フロントページの続き

(72)発明者 山本 敏央
 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 株式会
 社オリノバ内
 (72)発明者 新田 直人
 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 株式会
 社オリノバ内

(72)発明者 竹森 尚樹
 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 株式会
 社オリノバ内
 Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 CA05 CA07
 4B024 AA07 AA11 CA01 CA03 CA09
 DA01 FA10 HA08 HA14 HA19
 4B063 QA01 QA08 QA12 QA18 QQ04
 QQ42 QR08 QR14 QR55 QR59
 QR62 QS12 QS25 QS34